



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* l. SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 COMPARADO
CON AMPICILINA

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
CIRUJANO

AUTOR

JAIR ELOY CALDERÓN CHUQUILIN

ASESORES

DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

MG. BLGO. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2019



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

PÁGINA DEL JURADO

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Ocimum basilicum* L.
SOBRE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 COMPARADO CON AMPICILINA

DRA. Ana Chian Garcia

PRESIDENTE DEL JURADO

DRA. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez

SECRETARIA DEL JURADO

MG. Blgo. Jaime Abelardo Polo Gamboa

VOCAL DEL JURADO

Trujillo, febrero 2019

DEDICATORIA

A MI PADRES

Porque sin ellos no hubiera logrado una meta más en mi vida profesional. Por su amor, por su apoyo incondicional que me han brindado durante todo este tiempo y sé que lo seguirán haciendo.

A MI HEMRANO

Porque siempre estuvo a mi lado, enseñándome y educándome para ser mejor cada día.

A MI TIO DAVID CALDERÓN DE LOS RIOS

Porque siempre estuvo pendiente de mi durante estos años en la universidad aconsejándome y ayudándome en lo que pudiera.

JAIR CALDERÓN CHUQUILIN

AGRADECIMIENTO

A la universidad y a mis maestros

Por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado a este nivel.

A mis asesores

Por su experiencia y su apoyo incondicional, no se hubiera hecho realidad esta tesis.

Al personal técnico del laboratorio

Por su tiempo y atención brindada para el desarrollo de este trabajo de investigación

JAIR CALDERÓN CHUQUILIN

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Jair Eloy Calderón Chuquilin, estudiante de Medicina Humana, de la Escuela de Pregrado de la universidad César Vallejo, identificado con DNI N° 70000459, con la tesis titulada: Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina. A efectos de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompaña a la tesis son:

1. De mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, febrero del 2019

Jair Eloy Calderón Chuquilin

DNI N° 70000459

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Jair Eloy Calderón Chuquilin

INDICE

PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÒN	v
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA	1
1.2 TRABAJOS PREVIOS	2
1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA	3
1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	7
1.6 HIPÓTESIS	7
1.7 OBJETIVOS	8
II. MÉTODO	9
2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico	9
2.2 DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental con repeticiones múltiples, pos prueba.	9
O: Las observaciones	9
2.3 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN	9
2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA	11
III. RESULTADOS	13
IV. DISCUSIÓN	17
V. CONCLUSIONES	19
VI. RECOMENDACOINES	20
VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	21
VIII. ANEXOS	24

RESUMEN

El objetivo de esta investigación es determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina. Se realizaron las siguientes concentraciones: (al 100%, 75%, 50%, 25%), tratamiento estándar con ampicilina 10 mcg y control negativo con agua destilada. Encontrándose efecto inhibitorio al 100% con 12,4 mm de halo de inhibición (DS $1,2 \pm 0,37$ IC 95%: de 11,6 a 13,2) entre los intervalos de 10 a 14 mm; al 75% el diámetro del halo de inhibición medio alcanzo a 9.4 mm (DS $0,7 \pm 0,2$ IC 95%: de 8,9 a 9,9), con una mínima de 8 mm y una máxima de 10 mm; al 50% con un halo inhibitorio de 3,0 mm (DS $3,9 \pm 1,2$ IC 95%: de 0,2 a 5,8) entre los intervalos de 0 a 8 mm. Sin embargo, al 25% no se muestra halo de inhibición; para ampicilina el halo de inhibición fue de 23,4 mm (DS $1,3 \pm$ IC 95%: de 22,5 a 24,3) entre los intervalos de 21 a 25 mm. Mediante el análisis de varianza ANOVA se evidencia que los resultados fueron altamente significativos (0.000) $p < 0,01$. Las varianzas no fueron homogéneas por ello se aplicó la prueba Post ANOVA, test T3 de Dunnett que permitió comprobar el efecto de las concentraciones sobre los promedios de los diámetros del halo de inhibición, $p < 0,05$. Concluyendo así, que el aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. si bien evidencia cierto grado de inhibición, no sería considerándose eficaz por no superar el halo de inhibición establecido por los criterios del CLSI (>17mm)

Palabras clave: Efecto antimicrobiano, *Ocimum basilicum* L., *Enterococcus faecalis*, Ampicilina,

ABSTRACT

The objective of this research is to determine the antimicrobial effect of the essential oil of *Ocimum basilicum* L. on *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 compared to ampicillin. Concentrations of 100%, 75%, 50%, 25%, standard treatment with ampicillin 10 mcg, and negative control with distilled water were performed. There was 100% inhibitory effect with 12.4 mm zone of inhibition (SD 1.2 ± 0.37 95% IC 11.6 to 13.2) between intervals of 10 to 14 mm; at 75% the diameter of the medium zone of inhibition reached 9.4 mm (SD 0.7 ± 0.2 95% IC: 8.9 to 9.9), with a minimum of 8 mm and a maximum of 10 mm; 50% with a zone of inhibition of 3.0 mm (SD 3.9 ± 1.2 95% IC: 0.2 to 5.8) between intervals of 0 to 8 mm. However, at 25% no zone of inhibition is shown; for ampicillin, the zone of inhibition was 23.4 mm (SD 1.3 ± 0.2 95% IC 22.5 to 24.3) between the 21 to 25 mm intervals. ANOVA variance analysis showed that the results were highly significant (0.000) $p < 0.01$. The variances were not homogeneous, therefore the Post-ANOVA test was applied, Dunnett's T3 test allowed verification of the effect of the concentrations on the averages of the diameters of the zone of inhibition, $p < 0.05$. In conclusion, the essential oil of *Ocimum basilicum* L. although it evidences a certain degree of inhibition, would not be considered effective because it did not exceed the zone of inhibition established by the CLSI criteria (>17mm).

Keywords: Antimicrobial effect, *Ocimum basilicum* L., *Enterococcus faecalis*, Ampicillin

I. INTRODUCCIÓN

1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA

Las enfermedades que son causados por microorganismos patógenos ya sean bacterias, hongos, parásitos o virus, reciben el nombre enfermedades infecciosas. Este tipo de enfermedades se transmiten directamente o indirectamente, de una persona a otra ¹. La gran cantidad de casos de infecciones son producidos por las bacterias que pueden formar parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano, ya que son los organismos más abundantes en el planeta, causando un cuadro clínico característico dependiendo del órgano afectado del cuerpo humano².

Los enterococos son patógenos gram positivos que necesitan oxígeno para poder vivir, además forman parte de la flora intestinal normal y son encontrados en la naturaleza. En el ser humano la concentración de enterococos es de 10^5 a 10^7 UFC por gramo en heces.³

Se ha podido estudiar las cepas y la cantidad de especies de esta bacteria, llegando como resultado la cantidad de 36 especies, pero solo 26 han sido asociadas a productores de enfermedades ya sea en la comunidad o nosocomial en el ser humano, siendo las especies *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* las que más producen endocarditis, meningitis, ITU, etc, sobre todo en los pacientes hospitalizados por bastante tiempo, llevando un tratamiento prolongado con antibióticos.⁴

En el Perú, el género *Enterococcus* es uno de los agentes infecciosos más importantes ya que forman parte de las infecciones adquiridas en las Unidades de Cuidados Intensivos y además esta bacteria ha desarrollado varios mecanismos, los cuales, han generado una gran resistencia hacia distintos antibióticos.⁵

Actualmente se utilizaría algún antibiótico para atacar al agente y de esa forma mejorar el estado del paciente, pero el *Enterococcus faecalis* es un importante patógeno nosocomial que presenta una multirresistencia intrínseca a la mayoría de antibióticos⁶, lo que ha obligado a crear nuevas rutas terapéuticas como la medicina complementaria ya que existe una gran diversidad de plantas que ayudan a combatir contra esta bacteria nosocomial.⁴

Se puede utilizar la albahaca (*Ocimum basilicum* L.) ya que se ha comprobado científicamente su actividad contra este tipo de *enterococcus* así también contra patógenos humanos como bacterias, hongos entre otros, de esa forma esta planta puede ser utilizada simultáneamente con los antibióticos para disminuir el crecimiento de la bacteria.⁷

1.2 TRABAJOS PREVIOS

Rivas K. (Venezuela, 2015) determinó los compuestos químicos del aceite esencial de la albahaca y evaluó su actividad antibacteriana contra agentes gram positivos y gram negativos, encontrando que el *S. aureus* presentó un halo de inhibición de 11 mm y una CIM de 100 mg/mL y el *B. subtilis* mostró una CIM de 100 ng/mL, pero con un halo de inhibición de 12 mm. Las bacterias Gram negativas, presentaron un CIM de 200 mg/mL, pero, la *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. enteritidis* presentaron distintas zonas de inhibición, siendo estas de 9, 9 y 8 mm respectivamente.⁸

Colivet J. (Venezuela, 2011) incorporó la albahaca seca y fresca en los medios de cultivo de *S. aureus* y tuvo un efecto en el control del crecimiento de *S. aureus* ($p \leq 0,05$), logrando reducir 5 log₁₀ UFC/mL de la concentración inicial de *S. aureus* (8 log₁₀ UFC/mL).⁹

Acosta M. (Venezuela, 2003) caracterizó químicamente, de cuatro especies de la “albahaca”, los aceites esenciales y se les determinó la actividad antimicrobiana contra 18 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y 25 cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes de origen nosocomial, encontrando que los halos de inhibición del crecimiento de las cepas de este último y de las bacterias Gram negativas fueron 8 a 13 milímetros.¹⁰

Cosio H. (Peru, 2017) determinó el efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de albahaca, con concentraciones al 5%, 10% y 15%, sobre *Actinomyces viscosus*, comparado con la Clorhexidina. El efecto in vitro se determinó midiendo en la superficie de las 20 placas Petri y los halos de inhibición de crecimiento bacteriano.¹¹

Celis S. (Perù 2016) realizó un estudio donde se investigó el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. “albahaca” y tuvo estos resultados que el aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. “albahaca” al 10% alcanzó un halo de inhibición promedio de 7,15 mm, al

50% un halo de inhibición promedio de 9,10 mm y al 100% un halo de inhibición promedio de 13,95 mm de diámetro.¹²

Calderón J.(Perú 2014) utilizó 15 placas petri con cepas de la bacteria *Escherichia coli* y hojas de *Ocimum basilicum* L, evaluó el efecto antibacteriano de la albahaca en el crecimiento de la bacteria, encontrando que el para el extracto acuoso de 5g de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) el promedio inhibición bacteriano fue de 9.33mm, para el extracto acuoso de 10g de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) el promedio fue de 10.67mm, para el extracto acuoso de 20g de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) el promedio fue de 11.33mm en las tres repeticiones.¹³

1.3 TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Los enterococos fueron identificados como posibles patógenos de seres humanos, pero sólo en años recientes han comenzado a generar enfermedades importantes de origen nosocomial. La capacidad que tienen estas bacterias adquirir los diversos factores que les dan la resistencia hacia los antibióticos y de poder diseminarse y sobrevivir en los hospitales, complican mucho el tratamiento. La cepa clínica se denominó en un principio *Micrococcus zymogenes*, después se le nombró como *Streptococcus faecalis* subespecie *zymogenes*, actualmente conocida como *Enterococcus faecalis*. La capacidad de esta cepa de causar enfermedad grave en conejos y ratones mostró su potencial letal en los entornos apropiados.¹⁴

El *Enterococcus* está formado por cocos que se agrupan en parejas o cadenas cortas y son grampositivos. Pueden no presentar hemólisis o ser a-hemolíticos cuando crecen en agar sangre. Según la clasificación de Lancefield, pertenecen al grupo D. Las dos especies más frecuentes presentan distinta sensibilidad a los antibióticos por eso deben ser bien diferenciadas para poder encontrar un tratamiento correcto después de encontrar la especie que este causando la enfermedad en el paciente.¹⁵

En las muestras clínicas tienen el aspecto diplocólicas, de cadena corta o de cadena larga, también se pueden encontrar células solas. En un principio se les clasificó como estreptococos porque los microorganismos de los dos géneros comparten muchas características morfológicas y

fenotípicas, entre ellas la reacción negativa frecuente a la catalasa. Los enterococos se agruparon como un género distinto del de los estreptococos, ya que por medio de estudios de hibridación de DNA y después la secuenciación del rRNA 16S se demostró las diferencias entre estos dos grupos de bacterias. A diferencia de la mayor parte de los estreptococos, los enterococos proliferan en un medio con altas temperaturas (46°) y altas concentraciones de cloruro de sodio (p. ej., 6.5%) e hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares a 40%¹⁴

Las dos especies de enterococos que causan con más frecuencia infección son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, pero existen otras especies como *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus casseliflavus* que pueden generar enfermedades como ITU, endocarditis, meningitis, etc.¹⁶

Con respecto a la patogenia, las infecciones pueden provenir de la propia flora del paciente, pero también por transmisión desde el ambiente hospitalario. La principal forma de transmisión entre los pacientes son las manos del personal sanitario. Una instrumentalización o una intervención quirúrgica vuelve vulnerable las barreras mucosas fisiológicas, además los tratamientos antibióticos con cefalosporinas o con quinolonas producen desequilibrios ecológicos, lo cual representa un papel patógeno. Se ha demostrado la existencia de factores moleculares bacterianos de toxicidad sistémica, de inhibición del crecimiento de otras especies, de adherencia y de daño tisular que justifican las diversas manifestaciones clínicas y la patogenicidad.¹⁵

Estos microorganismos presentan adhesinas de superficie que ayudan la unión a las células de los tejidos intestinales del organismo humano y secretan enzimas con actividad hemolítica y proteolítica. Las bacterias no son capaces de evitar la destrucción por parte de las células fagocíticas.¹⁶

La prevalencia como patógeno nosocomial ha aumentado debido, al incremento de monitorización y de procedimientos terapéuticos invasivos en pacientes que estén graves, internados en el are de UCI, al uso de antibióticos de amplio espectro sin actividad frente a enterococos y al aumento del número de ingresos de pacientes inmunocomprometidos. Además de la resistencia que poseen frente a diversos antibióticos como: trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina, ampicilina, aztreonam, cefalosporinas, y de bajo a moderado nivel a aminoglucósidos.¹⁷

Los enterococos presentan sensibilidad hacia las penicilinas, además son resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, a todas las generaciones de cefalosporinas, a la clindamicina y a los aminoglucósidos. Las mutaciones espontáneas o la adquisición de genes de resistencia en plásmidos o en transposones aumentan el nivel de resistencia hacia los antibióticos.¹⁸

Actualmente se utilizaría algún antibiótico para atacar al agente y de esa forma mejorar el estado del paciente pero también se puede optar por la medicina complementaria ya que existe una gran diversidad de plantas que ayudan a combatir esta infección. Con respecto al tratamiento farmacológico, un fármaco que se puede utilizar es la Ampicilina, la cual es un antibiótico semisintético de efecto bactericida, de espectro ampliado. Su acción contra gram positivos es ligeramente inferior a la penicilina G pero tiene una notable potencia contra cierto número de gram negativos, esto se debe a su mayor afinidad por las PLPs y a su estructura que mejora su penetración a través de las porinas de las bacterias. Al ser un betalactámico, se une a las proteínas de unión a las penicilinas, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana.¹⁹

Con respecto a su farmacocinética, este fármaco se puede administrar vía oral y vía parenteral, tiene una unión a proteínas de 20 %, una semivida de 60-75 min, su metabolismo es hepático, su eliminación es por las heces y por la vía renal (25-40%). Se puede utilizar para manejar las infecciones de las vías respiratorias, de las vías renales, infecciones de la piel y tejidos blandos, etc. Esta penicilina tiene acciones adversas como flebitis, diarreas, anafilaxia, nefritis intersticial, convulsiones por infusión rápida, anemia hemolítica, etc.²⁰

La ampicilina se debe administrar con cuidado en personas con hipersensibilidad a las penicilinas, a los pacientes con insuficiencia renal, a los pacientes con historia de enfermedad de tracto intestinal. Con respecto a sus interacciones, existe un efecto sinérgico al administrar conjuntamente la ampicilina y la gentamicina, además si se administra con alopurinol, aumenta el riesgo de rash dérmico.²¹

Los tratamientos farmacológicos son buenos pero se puede optar por otras opciones, como la medicina complementaria, que utiliza elementos que son de fácil acceso a todas las personas y que tiene una gran efectividad. Los elementos que se utilizan con mayor frecuencia son las plantas, ya que tienen componentes indispensables y muy importantes que son los responsables de los distintos usos de estas. Un claro ejemplo es la albahaca (*Ocimum basilicum L.*), esta planta

tiene distintos usos como contra la anorexia, oliguria, edemas, dolor de estómago, flatulencias, estreñimiento, amigdalitis, faringitis, arritmias, insuficiencia coronaria, artiosclerosis, artritis, enfermedades de las vías urinarias y del riñón, depresión, antiespasmódica, el insomnio, analgésica, carminativa, antipirético, cicatrizante, diurética.²¹

La albahaca forma parte de la familia de *Lamiaceae* es una planta medicinal y aromática que cada vez más es usada por las personas porque tiene un efecto antimicrobiano debido al aceite que presenta esta planta ha demostrado tener activos que cumplen distintas funciones tales como nematocidas, insecticidas, antimicrobianos. Estos elementos activos se encuentran principalmente en las flores de esta planta mundialmente famosa, principalmente en América latina y en Asia.²²

Es una hierba anual que crece en muchas regiones alrededor del mundo, cuyo origen se cree que fue en la india. Existe una gran diversidad de tipos o variedades de albahaca que tienen distinto color de hoja y también distintos aromas. Puede alcanzar los 20 a 60 cm de largo y sus flores son de color blanco y morado. Se ha reportado que las hojas pueden ser utilizadas para tratar el dolor y la tos.²⁰

En las flores de la albahaca se encuentra su aceite principal y se puede obtener mediante la destilación con arrastre de vapor de agua siendo muy utilizado en la industria fundamentalmente como condimento y saborizante.²²

La composición química de la albahaca está constituida por derivados terpénicos, saponias, aceites esenciales, potasio, sales de calcio, micilagos, tanino y safrol. Estos elementos son los responsables de las distintas funciones que tiene esta planta las cuales son benéficas para el ser humano y lo mejor de todo es que tiene pocos efectos adversos y está al alcance de cualquier persona en este mundo.²³

Con respecto a las formas de prepararlo, puede ser utilizado como infusión y como tintura. Cuando se prepara como infusión, la indicación es la siguiente: 3-5g/tazas 3 veces al día, y la indicación de la tintura es la siguiente: 30-60 gotas/día y 6-10 gotas/día de esencia, se utilizan para el tratamiento de vómito, dolor de estómago, tos, espasmo gastrointestinales.²³

1.4 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con Ampicilina a la concentración de 10 mcg?

1.5 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las infecciones causadas por *Enterococcus faecalis* constituye uno de los problemas de salud nosocomiales más frecuentes de nuestro medio ya que produce enfermedades como: endocarditis, infecciones del tracto urinario, peritonitis, meningitis, etc.

Actualmente, este agente tiene la capacidad de sobrevivir y diseminarse en el entorno hospitalario y de adquirir nuevos genes de resistencia a antibióticos; ante esta problemática, es conveniente hacer un estudio experimental con el fin de buscar nuevas formas de tratar estas condiciones, motivo por el cual esta investigación está orientada a utilizar la “albahaca” como alternativa al tratamiento terapéutico ya estandarizado, basándonos en sus principios activos y teniendo como referencia el uso que le da la población ya que está al alcance de todas las personas y tienen pocas contraindicaciones.

1.6 HIPÓTESIS

- H₁: El aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. tiene efecto antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con Ampicilina a la concentración de 10 mcg.
- H₀: El aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. no tiene efecto antimicrobiano sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con Ampicilina a la concentración de 10 mcg.

1.7 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con Ampicilina a la concentración de 10 mcg.

1.6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Establecer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. al 100%
- Establecer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. al 75%
- Establecer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. al 50%
- Establecer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. al 25%
- Determinar el efecto antimicrobiano Ampicilina a la concentración de 10 mcg.

II. MÉTODO

2.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

2.2 DISEÑO DE INVESTIGACION: Experimental con repeticiones múltiples, pos prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	-	O6

Donde:

RG: grupos de estudio: O6

X1: aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca" al 25 %

X2: aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca" al 50 %

X3: aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca" al 75 %

X4: aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca" al 100 %

X5: tratamiento con ampicilina a la concentración de 10 mcg.

X6: control negativo: agua destilada

O: Las observaciones

2.3 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

Variable Independiente: Agente antimicrobiano

- Administración no farmacológica: El aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca"
- Administración farmacológica: Ampicilina a la concentración de 10 mcg.

Variable dependiente: Efecto antimicrobiano

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable Independiente: Agente antimicrobiano	Para el tratamiento de <i>Enterococcus faecalis</i> se utiliza: Tratamiento no farmacológico con <i>Ocimum basilicum</i> l. "Albahaca" Tratamiento farmacológico con Ampicilina	La población será dividida en los siguientes grupos: <i>Ocimum basilicum</i> l. "Albahaca" al 100% <i>Ocimum basilicum</i> l. "Albahaca" 75% <i>Ocimum basilicum</i> l. "Albahaca" al 50% . <i>Ocimum basilicum</i> l. "Albahaca" al 25 % Ampicilina (10 mcg) Agua destilada	a) RG1 b) RG2 c) RG3 d) RG4 e) RG5 f) RG6	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antimicrobiano	Es el aumento del halo de inhibición por medio del método Kirby Bauer.	Se considera efectivo: Sensible ≥ 17 mm Intermedio ²⁴ Resistente ≤ 16mm ²⁴	Efectivo (≥ 17mm) No efectivo (< 17mm)	Cualitativa nominal

2.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACION: Estuvo constituida por todas las cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 cultivadas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

MUESTRA:

Tamaño de muestra: Por tratarse de un trabajo experimental se empleó la fórmula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para hallar el número de placas necesarias que validen la investigación. Para el presente estudio el número de repeticiones resultó 9 (pero se consideraron 10 repeticiones para cada tratamiento administrado) se realizaron 60 observaciones. **(ANEXO 01)**

Unidad de análisis: Cada grupo de colonias cultivadas.

Unidad de muestra: Cada una de las placas de Petri conteniendo los cultivos.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

Todas las cepas viables

Criterios de exclusión:

Cultivos contaminados

Cepas inertes que no demuestren crecimiento bacteriológico.

2.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: Consistió en la observación del crecimiento bacteriano en las placas petri.

PROCEDIMIENTO: Se pidió el permiso correspondiente al Laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo para el procesamiento respectivo de la planta. (Anexo 2)

- a. Tipificación de la planta por el laboratorio de biología de la Universidad Privada Antenor Orrego.
- b. Obtención del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca" por el método de arrastre de vapor de agua.²⁴
- c. El proceso de cultivo de la bacteria fue mediante el método agar Mueller-Hinton.
- d. Prueba de sensibilidad antimicrobiana: el método de disco de difusión Kirby Bauer²⁴.

INSTRUMENTO: Se utilizó una ficha de recolección de datos donde se anotó la valoración de concentración inhibitoria mínima, según los rangos establecidos en la ficha y su eficacia y según las diferentes concentraciones (ANEXO 02)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

Fue validado por 3 expertos en el área de Microbiología, quien evaluó las variables de estudio y los ítems considerados y determinó que si son relevantes al estudio y tienen claridad, objetividad, actualidad, organización, suficiencia, consistencia, coherencia, metodología y oportunidad para su aplicación. (Anexo 04).

2.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información transcrita en la ficha de recolección de datos fue procesada en la base de datos en el programa SPSS versión 25 para Windows. Para los gráficos se utilizarán el diagrama de cajas o bigotes. Para el análisis de la información se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros y post ANOVA de T3 de dunnett.

2.7 ASPECTOS ÉTICOS:

Para el presente trabajo de investigación se tomó en cuenta las medidas de bioseguridad para el personal que obtiene y manipula muestras biológicas en laboratorio²⁶. Ver Anexo 5.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina.

Tratamiento	Media	DE	Desv. Error	95% de IC para la media		Me	Mín	Máx	Rango IC
				L I	LS				
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	3	3.9	1.2	0.2	5.8	0	0	8	7.3
75	9.4	0.7	0.22	8.9	9.9	9.5	8	10	1
100	12.4	1.2	0.37	11.6	13.2	12	10	14	1.3
ampicilina	23.4	1.3	0.4	22.5	24.3	23.5	21	25	1.5

DE=Desviación Estándar; Min=Mínimo; Máx=Máximo; Me = Mediana

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25

Tabla 2. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina

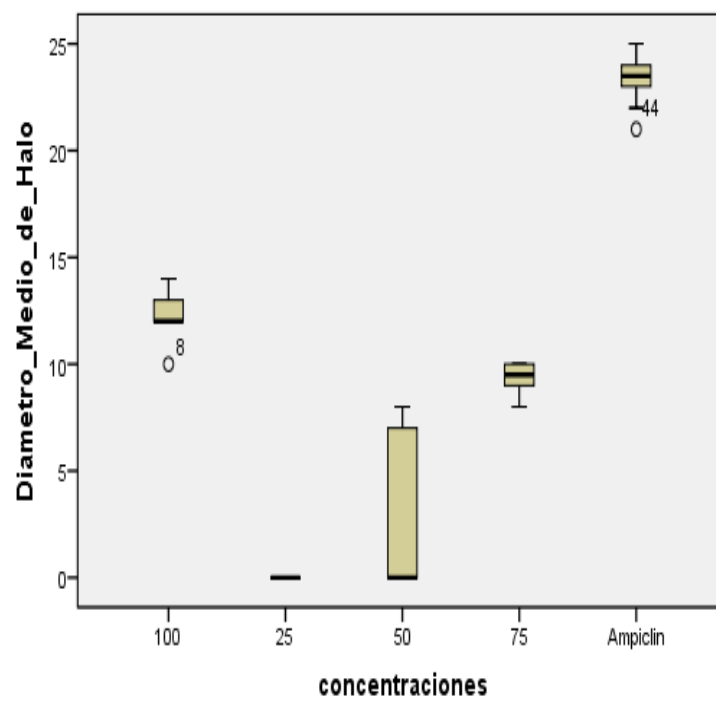
ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6175.6	4.0	1543.9	416.3	.000
Dentro de grupos	166.9	45.0	3.7		
Total	6342.5	49.0			

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25

Tabla 3. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina

Post Anova T3 de Dunnett					
Subconjunto para alfa = 0.05					
	N	1	2	3	4
25	10	0.0			
50	10	3.0			
75	10		9.4		
100	10			12.4	
ampicilina	10				23.4
Sig.		1.0	1.0	1.0	1.0

Fuente reporte de resultados del SPSS versión 25



Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

Gráfico 01: Efecto del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con Ampicilina a la concentración de 10 mcg

IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio experimental se evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Ocimum basilicum* L. (albahaca) frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con el efecto antimicrobiano de ampicilina de 10 mcg. Se realizaron 10 repeticiones por cada grupo de experimentación, con un total de 60 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representaban el aceite esencial del *Ocimum basilicum* L. (albahaca) a distintas concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%), el patrón de ampicilina 10 mcg y agua destilada (DMSO).

En la tabla 01 se observa las medidas de los diámetros de los halos de inhibición, donde encontramos que la dilución 25% no presenta efecto inhibitorio. Recién se evidencia efecto antibacteriano a partir de la dilución al 50 % con un halo inhibitorio de 3,0 mm (DS $3,9 \pm 1.2$ IC 95%: de 0,2 a 5,8) entre los intervalos de 0 a 8 mm. A la concentración 75%, el diámetro del halo de inhibición medio alcanza a 9.4 mm (DS $0,7 \pm 0.2$ IC 95%: de 8,9 a 9,9), con una mínima de 8 mm y una máxima de 10 mm; a la concentración del 100 % se obtiene un halo inhibitorio de 12,4 mm (DS $1,2 \pm 0.37$ IC 95%: de 11,6 a 13,2) entre los intervalos de 10 a 14 mm; considerándolo que si tiene efecto sobre cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, pero no supera los valores del CLSI (superiores a los 17mm) resultando no eficaz en esta concentración, entonces podríamos decir que si se aumenta la concentración del producto o a otras presentaciones podría tener mejor eficacia. En relación a Ampicilina, el halo de inhibición fue de 23,4 mm (DS $1,3 \pm$ IC 95%: de 22,5 a 24,3) entre los intervalos de 21 a 25 mm considerándose ser sensible.

El análisis de varianza ANOVA (tabla 02) evidencia que los resultados fueron altamente significativos (0.000) con un valor de $p < 0.01$. Las varianzas no fueron homogéneas por ello se aplicó la prueba Post ANOVA, test T3 de Dunnett (tabla 03) que permitió comprobar el efecto de las concentraciones sobre los promedios de los diámetros del halo de inhibición, $p < 0,05$. Y en la Figura 01, se puede visualizar estas diferencias de las medias de los halos de inhibición de los grupos estudiados, donde se observa que el aceite esencial si bien evidencia cierto grado de

inhibición, no sería considerándose eficaz por no superar el halo de inhibición establecido por los criterios del CLSI.

Mayor halo de inhibición evidenció el estudio de Celis S.¹², encontró un halo de inhibición de 13,95 mm de diámetro a una dilución del 100%. Los resultados de Acosta M.¹⁰ fueron parecidos, observó que los halos de inhibición del crecimiento de las bacterias Gram positivos y Gram negativas fueron de 8 y 13 milímetros respectivamente. Por otro lado, valores menores en los halos de inhibición encontraron Rivas K.⁸ con el aceite esencial de la albahaca el halo de inhibición fue de 11 mm. Del mismo modo Calderón J.¹³ determinó que con 20g del extracto acuoso de la *Ocimum basilicum* L. “albahaca” el promedio de inhibición bacteriano de fue de 11.33mm.

El efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de albahaca está relacionado con los componentes o principios activos que este contiene, tales como el linalol, 1,8-cinelol, eugenol, estragol. Se ha propuesto que los mecanismos de acción que estarían implicados en el efecto antibacteriano serían, inhibición de la síntesis de la pared celular, lesión de la membrana citoplasmática e inhibición de la síntesis de proteínas.

Se ha demostrado que existen otros componentes químicos de los aceites esenciales de la albahaca que no tienen un efecto antimicrobiano, pero sirven para aumentar el poder antimicrobiano de los demás o como soporte, tal es el caso del p-cimeno, que aumenta el efecto antimicrobiano.

Los resultados del efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Ocimum basilicum* L. (albahaca) encontrados en esta investigación comparado con los resultados de los trabajos previos citados son distintos, esto se podría deber a factores externos que influyen en la calidad de la planta como son: la zona de cultivo de la planta, el clima, la calidad de suelo, la altitud de la zona donde fueron recolectadas las plantas la técnica de cultivo, el método utilizado para la obtención del aceite esencial. Además, otro factor importante que influye en el efecto antimicrobiano es la concentración que se utiliza en el experimento, el cual, al ser mayor, el efecto antimicrobiano será mayor.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial del *Ocimum basilicum* L. (albahaca) frente a la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 a mayor concentración tiene efecto antimicrobiano, pero no sería considerado eficaz por no superar el halo de inhibición establecido por los criterios del CLSI (>17mm)
2. A la dilución de 25%, no evidenció efecto antibacteriano frente a cepas *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
3. Al 50 % se evidencia un halo de inhibición de 3,0 mm, considerado resistente.
4. A la concentración 75%, el diámetro del halo de inhibición alcanzo a 9.4 mm, considerado resistente.
5. A la concentración del 100 % el halo de inhibición de 12,4 mm, considerándolo indiferente.
6. La ampicilina a 10 mcg mostró un halo de inhibición de 23,4 mm, siendo sensible.

VI. RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio a otro tipo de presentaciones de los extractos a diferentes diluciones contra el mismo patógeno o con otros.
- Utilizar antibióticos y el aceite esencial de *Ocimum basilicum* como coadyuvante para evaluar si existe sinergia entre sí
- Comparar el efecto antibacteriano de la planta con otras de la misma especie pero que provengan de lugares distintos para comprobar si tienen o no las mismas propiedades.
- Utilizar el aceite esencial de *Ocimum basilicum* frente a otros patógenos Gram positivos y Gram negativos.
- Aplicar este estudio en animales para poder valorar la eficacia antibacteriana así como el efecto citotóxico del aceite esencial de *Ocimum basilicum* que pueda producir.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Chin J. El control de las enfermedades transmisibles, Asociación estadounidense de Salud Pública 17° edición Organización Panamericana de la Salud, Washington, DC: OPS, © 2001. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/166270/1/9275315817.pdf>
2. Flores T, Vargas A. Morfología Bacteriana. Rev. Act. Clin. Med [revista en la Internet]. [citado 2017 Ago 20]. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014001000002&lng=es.
3. Tyne D, Melissa J, Martin C. Structure, Function, and Biology of the Enterococcus faecalis Cytolysin, Department of Ophthalmology and Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 243 Charles St., Boston, Toxins 2013, 5, 895-911. Disponible en: <http://images.biomedsearch.com/23628786/toxins-05-00895.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIBOKHYOLP4MBMRGQ&Expires=1508112000&Signature=LVtcNdlQQtHSYf1OzoZItYXdLoc%3D>
4. Medell M, Hart M, Batista M. Sensibilidad antimicrobiana in vitro en aislamientos de Enterococcus faecalis y Enterococcus faecium obtenidos de pacientes hospitalizados, Departamento de Microbiología, Hospital Clínico-Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, La Habana, Cuba, 2014;34(Supl.1):50-7. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v34s1/v34s1a07.pdf>
5. Garza V, Hernández A, Mejía Ch. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de Enterococcus faecalis. Laborat acta. 2002. Vol 14, N°1, p: 11-20. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>
6. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus, University of Northampton, School of Health, Park Campus, Boughton Green Road, Northampton NN2 7AL, UK, Microbiology (2009), 155, 1749–1757. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/155/6/1749.pdf?expires=1508318055&id=id&accname=guest&checksum=7F977883AEF02E2EC45758282B2F17DE>
7. López M, Hernández L, Rodríguez C. Estudio Farmacognóstico de Ocimum basilicum L. Albahaca blanca, Rev Cubana Farm 2000;34(3):187-95. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v34n3/far06300.pdf>

8. Rivas K, Rivas C, Gamboa L. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de albahaca (*Ocimum basilicum* L.), Venezuela, Vol.15, Nº 3, 2015 (281 - 289). Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/904/90444727006.pdf>
9. Colivet J, Marcano G, Belloso G, Brito D. Efecto antimicrobiano de extractos etanólicos de albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, Revista Ven. CTA. 2 (2): 313-320. 2011. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Julio_Colivet/publication/292965351_Antimicrobial-effect-of-ethanolic-extracts-from-basil-Ocimum-basilicum-L-on-growth-of-Staphylococcus-aureus/links/573c7d1508ae9ace840fd863/Antimicrobial-effect-of-ethanolic-extracts-from-basil-Ocimum-basilicum-L-on-growth-of-Staphylococcus-aureus.pdf
10. Acosta M, González M, Araque M, Velazco E, Khouri N. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. var *basilicum*, *O. basilicum* L. var *purpurens*, *O. gratissimum* L., y *O. tenuiflorum* L., y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial, Rev de la facultad de farmacia, Vol. 45 (1) 2003. Disponible en: http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23812/1/acosta_m.pdf
11. Cosio H, Rodríguez J. Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de albahaca (*Ocimum basilicum*) sobre el crecimiento de *Actinomyces viscosus*, Ciencia y Desarrollo 20 (1): 65-73 Enero-Junio 2017. Disponible en: <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/viewFile/1409/1380>
12. Celis M, Rodríguez R. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Ocimum basilicum* L. "albahaca" en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario atendidos en consultorio externo de Urología del Hospital Regional de Cajamarca – 2016 {Tesis}. Disponible en: <http://repositorio.upagu.edu.pe/bitstream/handle/UPAGU/459/FYB-003-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
13. Calderon J, Torres A. Efecto del extracto acuoso de la *Ocimum basilicum* L. (albahaca) en el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. Revista ECI Perú 10 (2), Perú, 2014. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4814652.pdf>
14. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson L, Loscalzo J. Harrison Principios de Medicina Interna. 19 Edición Ed. México: McGrawHill; 2016.p.

15. Rozman B, Cardellach F. Farreras Medicina Interna. 17 Edición Ed. España: Elsevier; 2016.p. 829-836
16. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. microbiología Médica, 6° ed, España, Elsevier, 2009, Cap 18, 179-188
17. Fernández F, Aguado J, González M. Bacteriemia por *Enterococcus faecalis*, Rev Clin Esp 2004;204(5):244-50. Disponible en: <http://www.revclinesp.es/es/bacteriemia-por-enterococcus-faecalis/articulo/13061409/>
18. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España, Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(Supl 5):59-65. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>
19. Katsung B, Masters S, Trevor A. Farmacología Basica y Clínica, 12 ed, Mc Graw Hill, Mexico, 2012
20. Florez J, Armijo J, Mediavilla A. Farmacología Humana, 6 ed, Elsevier, España, 2014
21. Arango M. Plantas medicinales. Editorial Botánica de interés médico. Colombia. Colombia. (2006). 227.
22. Fonnegra G. et al. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Colombia. (2007). 371.
23. Lopez M, Villavicencio O. Manual de fitoterapia, EsSalud, Organización Panamericana de salud, Perú, 2011. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/indice.pdf>
24. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
25. Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA.
26. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra ed.Ginebra:2005

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 2(\bar{y})^2}{(X_1 - x_2)^2}$$

Donde:

- $Z_{\alpha/2}$: 1.96 (nivel de confianza al 95%)
- Z_{β} : 0.842 (potencia estadística de 80 %)
- X_1 : 17 mm (diámetro del halo de inhibición de la ampicilina) ²⁴
- x_2 : 9 mm (diámetro del halo de inhibición del aceite esencial *Ocimum basilicum* L. "Albahaca") ¹¹
- \bar{y} : 6 ¹¹

n: 9 repeticiones por cada dilución, se redondeó a 10 repeticiones

ANEXO 02

A) CERTIFICACION DE LA PLANTA POR PARTE DE LA UNIVERSIDAD ANTENOR ORREGO



UPAO

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 07-2019-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

Que **Jair Eloy Calderón Chuquilín**, egresado de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

Ocimum basilicum L. (Lamiaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: «Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina».

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 8 de febrero de 2019



Mg. Segundo Leiva González

Director

Museo de Historia Natural y Cultural

ANEXO 02

B) PROCESO DE EXTRACCION DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA

1. Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Ocimum basilicum* L. "Albahaca", se obtendrán en el mercado La Hermelinda de Trujillo, procedentes de la localidad de Simbal, en una cantidad de 5 a 6 Kg aproximadamente y se llevarán al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionarán los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtendrá la "muestra fresca" (MF). La MF se lavará con agua destilada clorada, se colocará sobre una bandeja de cartulina y se llevará a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidratará. Después, se estrujará manualmente el vegetal seco hasta que se obtenga partículas muy pequeñas y se almacenarán herméticamente en bolsas negras. A esto se le considerará como "muestra seca" (MS).

2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. se obtendrá por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocará 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocará la MS hasta que llene las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparán herméticamente y estarán conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estará conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocará en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentará con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasará a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastrará los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor pasará hacia el condensador en donde se convertirá en líquido que será recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disociará en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizará en 2 horas. De este modo, se obtendrá el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocará en un frasco de vidrio ámbar y se reservará a 4°C hasta su utilización.

3. Preparación del medio de cultivo

Se utilizará agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparará suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizará en autoclave a 121°C por 15 minutos

Después, se servirá en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejará reposar hasta que se solidifique completamente.

ANEXO 02

C) DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA

1. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)

Se evaluará utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se considerará los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomará en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparará colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionará una alícuota del microorganismo *Enterococcus faecalis*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observará una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml aprox.)

b) Siembra del microorganismo

Se sembrará el microorganismo *Enterococcus faecalis*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedará como una capa en toda la superficie.



c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararán 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como

solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularán 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocará 750 μ L de AE y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de AE y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%, y 250 μ L de AE y 750 μ L de DMSO al tubo de 25%.



d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

A partir de cada una de las concentraciones, se colocará 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman Nº 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomará 10 μ L de AE al 25% y se colocará en un disco, 10 μ L de AE al 50% en otro disco, 10 μ L de AE al 75% en otro disco y 10 μ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

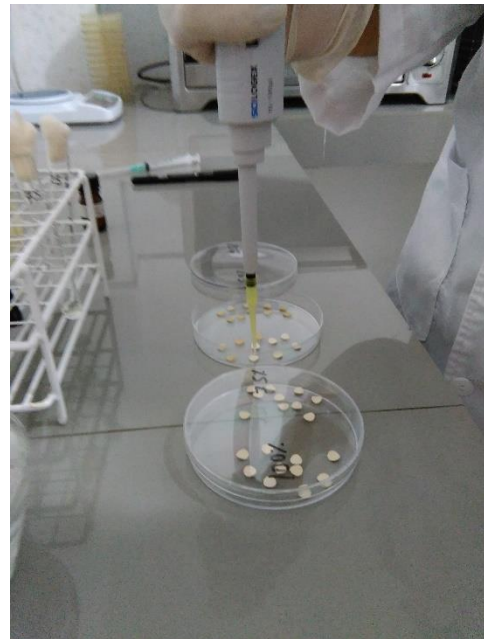
Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomarán los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocarán en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Enterococcus faecalis*, de tal modo que quedarán los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocará el disco con Ampicilina (control positivo). Se dejarán en reposo por 15 min y



después las placas se incubarán de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizará observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizará para cada una de las concentraciones de AE de *Ocimum basilicum* L. y para la Ampicilina. Se interpretará como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



ANEXO 3

MATRIZ DE RECOLECCION DE DATOS

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS PARA MEDIR EL TAMAÑO DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)

SOBRE CEPAS DE *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Nº DE PLACAS	Aceite Esencial de Albahaca				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	AMPICILINA 10ug	DMSO
	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
PLACA 1	14	10	7	0	24	0
PLACA 2	12	9	0	0	22	0
PLACA 3	13	9	0	0	23	0
PLACA 4	12	10	0	0	21	0
PLACA 5	12	10	8	0	23	0
PLACA 6	13	10	0	0	23	0
PLACA 7	12	10	7	0	24	0
PLACA 8	10	8	8	0	24	0
PLACA 9	14	9	0	0	25	0
PLACA 10	12	9	0	0	25	0
Promedio del diámetro del halo de inhibición	12,2	9,3	2,5	0	23,3	0

ANEXO 04

VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA A (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
2	✓		✓		✓		✓		✓		✓	
3	✓		✓		✓		✓		✓		✓	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES				SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos				✓		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación				✓		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				✓		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				✓		
VALIDEZ						
APLICABLE	✓	NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN		

Instrumento validado por:

Jaime A. Polo Gamboa
Firma y sello
CBP 6451

Dr. Steve T. Hurtado Escamilo
Firma y sello
Especialista en Psicología Clínica
CBP: 2288. RINGERO
RED ASISTENCIAL LA LIBERTAD

Dra. María P. Ayala R.
Firma y sello
C.B.P. 1206

ANEXO 05

Bioseguridad para el área de laboratorio clínico

- Se Utilizará permanentemente en el área de trabajo los elementos de protección personal: mascarilla, gorro, bata blanca y guantes.
- Cuando el procedimiento lo amerite o se presuma un probable riesgo de Salpicadura, usar delantal plástico.
- Los recipientes para muestras pueden ser de vidrio o, preferiblemente, de plástico. Deben ser fuertes y no permitir fugas cuando la tapa o el tapón estén correctamente colocados.
- Se Realizará los procedimientos empleando las técnicas correctas para minimizar el riesgo de salpicaduras o derrames.
- Si se usará pipetas automáticas para evitar cualquier riesgo de contaminación oral. El pipetear líquidos con la boca es una práctica inadecuada y altamente riesgosa.
- Las cánulas, tubos contaminados y demás elementos de trabajo deben someterse a procesos de desinfección, desgerminación y esterilización en autoclave; igual tratamiento deberá darse a las cánulas, tubos y demás elementos de trabajo.
- A los tubos de ensayo con sangre en coágulos, se les debe colocar hipoclorito de sodio a 5000 ppm. durante 30 minutos, taparlos y una vez desechado este contenido, proceder a la desgerminación y esterilización mediante calor húmedo o seco para su posterior reutilización.
- Los demás fluidos orgánicos (flujos, cultivos, entre otros) deben tratarse mediante desinfección con hipoclorito a 5.000 ppm. durante 30 minutos.
- El material contaminado que deba ser desechado fuera del laboratorio, debe introducirse en recipientes resistentes, que se cerrarán antes de sacarlos del laboratorio, estos a su vez se depositaran en bolsa Roja rotulada como: “Riesgo Biológico – material contaminado a incinerar”, y entregarla al personal del Aseo para su disposición final.
- Los procedimientos que entrañan manipulación de cultivos de células infectadas, manejo de material con elevadas concentraciones de bacterias y actividades que generen aerosoles o gotitas como en los procedimientos de homogeneización y mezcla rigurosa, deben llevarse a cabo utilizando cabinas de seguridad biológica.
- El personal de Microbiología, debe utilizar además del equipo de protección personal básico, la mascarilla de alta eficiencia.

- En forma permanente se deben conservar las puertas del laboratorio cerradas, evitar el ingreso de personas ajenas al área; si ello ocurre éstas deben ser informadas sobre los posibles riesgos y deberán cumplir con las normas exigidas dentro del laboratorio. Igualmente se debe restringir el acceso de niños.
- Limite el empleo de agujas y jeringas utilícelas solo cuando sea estrictamente necesario. En tales casos emplea las precauciones universales indicadas.
- Se tomará en cuenta los protocolos de calidad del comité nacional de estándares de laboratorio clínico (NCCLS), revisando los parámetros M2, M23, M45, M100.
M2: estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por disco.
M23: desarrollo de criterios y parámetros de control de calidad para pruebas de susceptibilidad in vitro.
M26: Métodos para determinar la actividad bactericida de los agentes antimicrobianos
M100: estándares de desempeño para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

ANEXO 6

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Diametro

T3 Dunnett

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	3,00000*	,43205	,000	1,6012	4,3988
	3,00	9,40000*	1,28409	,000	5,0039	13,7961
	4,00	12,40000*	,37118	,000	11,0817	13,7183
	5,00	-11,00000*	,54569	,000	-12,7207	-9,2793
2,00	1,00	-3,00000*	,43205	,000	-4,3988	-1,6012
	3,00	6,40000*	1,24900	,005	2,0282	10,7718
	4,00	9,40000*	,22111	,000	8,6147	10,1853
	5,00	-14,00000*	,45704	,000	-15,4897	-12,5103
3,00	1,00	-9,40000*	1,28409	,000	-13,7961	-5,0039
	2,00	-6,40000*	1,24900	,005	-10,7718	-2,0282
	4,00	3,00000	1,22927	,255	-1,3660	7,3660
	5,00	-20,40000*	1,29271	,000	-24,8045	-15,9955
4,00	1,00	-12,40000*	,37118	,000	-13,7183	-11,0817
	2,00	-9,40000*	,22111	,000	-10,1853	-8,6147
	3,00	-3,00000	1,22927	,255	-7,3660	1,3660
	5,00	-23,40000*	,40000	,000	-24,8207	-21,9793
5,00	1,00	11,00000*	,54569	,000	9,2793	12,7207
	2,00	14,00000*	,45704	,000	12,5103	15,4897
	3,00	20,40000*	1,29271	,000	15,9955	24,8045
	4,00	23,40000*	,40000	,000	21,9793	24,8207

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 7



San José
LABORATORIO CLÍNICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. JAIR ELOY CALDERÓN CHUQUILÍN estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 comparado con ampicilina", durante los días 24 al 2 de diciembre de 2018, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 11 días del mes de diciembre de 2018.



Jaime Abelardo Polo Gamboa
Microbiólogo - Microbiología
C.R.P. 0391

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

